

[11] Patent/Publication Number: JP7196686A

[43] Publication Date: Aug, 1 1995

---

[54] TAN 1746 COMPOUNDS, THEIR PRODUCTION AND USE THEREOF

[72] Inventor(s):

YOSHIMURA KOJI; ,  
TSUBOYA SHIGETOSHI; ,  
OKAZAKI KENJIRO; ,

[71] Assignee/Applicant:

TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD; ,

[30] Priority:

JP Jan, 6 1994 JP1994295A

[21] Application Number: JP1994295A

[22] Application Date: Jan, 6 1994

[51] Int. Cl.<sup>8</sup>: C12P002104 A61K003800 A61P003500 C07K000120 C07K000512 C07K0014195  
C07K001441 C12R000101

[57] ABSTRACT

PURPOSE: To obtain a TAN-1746 compound exhibiting excellent antitumor activity and useful as an agent for the treatment of malignant tumor of man or mammals by culturing a microorganism which belongs to the genus Verticillium and capable of producing TAN-1746 in a medium. CONSTITUTION: This TAN-1746 compound which is a new compound expressed by formula [R is an (acylated)hydroxyl group] and useful as a therapeutic agent for malignant tumor can be produced by inoculating a microbial strain which belongs to the genus Verticillium and capable of producing TAN-1746 compound (e.g. Verticillium chlamydosporium FL-36581 strain) to a medium, culturing at 28°C for 48 hr on a reciprocating shaker, transplanting the obtained seed culture liquid to a medium in a stainless steel tank, culturing under aeration and agitation at 28°C for 6 days, filtering the culture liquid, extracting the filtrate with ethyl acetate, removing the solvent from the extract by distillation and purifying the product by silica gel chromatography. COPYRIGHT: (C)1995,JPO&Japio

\* \* \* \* \*

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-196686

(43)公開日 平成7年(1995)8月1日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
C 07K 5/12  
A 61K 38/00  
C 12P 21/04  
// (C 12P 21/04

識別記号 庁内整理番号  
8318-4H  
ADU  
9282-4B

F I

技術表示箇所

A 61K 37/02 ADU  
審査請求 未請求 請求項の数 5 OL (全 10 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願平6-295

(22)出願日 平成6年(1994)1月6日

(71)出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72)発明者 吉村 浩二

大阪府豊能郡豊能町新光風台4丁目4番地  
の11

(72)発明者 塙谷 重利

兵庫県川西市多田院2丁目23番5号

(72)発明者 岡崎 賢治朗

和歌山県橋本市城山台3丁目5番地の6

(74)代理人 弁理士 岩田 弘 (外5名)

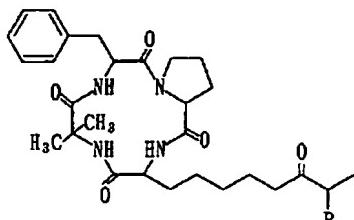
(54)【発明の名称】 化合物TAN-1746類、その製造法および用途

(57)【要約】

【目的】腫瘍治療剤として有用な化合物を提供する。

【構成】一般式

【化1】



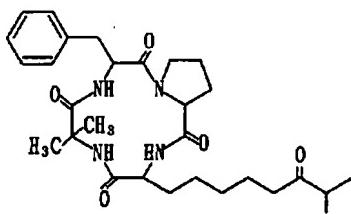
(式中、Rはエステル化されていてもよい水酸基を示す)で表される化合物またはその塩。

【効果】本発明の化合物またはその塩は、優れた抗腫瘍作用を示し、ヒトあるいは哺乳動物の悪性腫瘍の治療に用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】一般式

【化1】



(式中、Rはアシル化されていてもよい水酸基を示す)  
で表される化合物またはその塩。

【請求項2】Rが水酸基である請求項1記載の化合物TAN-1746。

【請求項3】バーティシリウム属に属し、化合物TAN-1746を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に化合物TAN-1746を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする化合物TAN-1746の製造法。

【請求項4】請求項1記載の化合物またはその塩を含有してなる抗腫瘍剤。

【請求項5】化合物がTAN-1746である請求項4記載の抗腫瘍剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は抗腫瘍剤として有用な新規環状ペプチド化合物TAN-1746（以下、TAN-1746と略称することもある）に関する。

【0002】

【従来の技術】環状ペプチドとして、マウスの肥満細胞腫の増殖抑制作用を有するクラミドシン（Chlamydocin）〔ヘルベチカ・キミカ・アクタ（Helvetica Chimica Acta）、第57巻、533頁（1974年）、ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・キャンサー（European Journal of Cancer）、第10巻、801頁（1974年）等〕、抗腫瘍作用を示すトラポキシン（Trapoxin）AおよびB〔ザ・ジャーナル・オブ・アンチビオチクス（The Journal of Antibiotics）、第43巻、1524頁（1990年）〕等が知られている。

【0003】

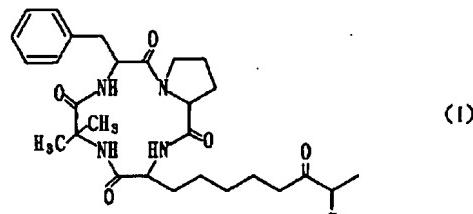
【発明が解決しようとする課題】悪性腫瘍による死亡例は年々増加の一途をたどっており、有効な新しい治療法の開発が切望されている。中でも、化学療法の分野では、現在使用されている抗腫瘍剤の効果が充分なものとは言えず、悪性腫瘍を完全に抑制できる新しい抗腫瘍剤の開発が求められている。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる現状に鑑みて、新たな観点から研究を重ねた結果、土壤から分離された多数の微生物中、ある種の微生物が新規物

質を产生すること、該微生物がバーティシリウム属に属すること、該微生物を適宜の培地に培養することによって、ヒトおよび動物細胞由來の癌細胞の増殖を阻害し、ras ガン遺伝子で形質転換したマウスN1H3T3細胞の形態を正常細胞様に復帰する活性化合物を培地中に蓄積しうることを知り、活性化合物を単離し、これをTAN-1746と称することにした。本発明者らは、この化合物の物理化学的および生物学的性質から新規物質であることを確かめ、さらに検討を加えた結果、本発明を完成した。本発明は、（1）一般式

【化2】



(式中、Rはアシル化されていてもよい水酸基を示す)  
で表される化合物またはその塩、（2）Rが水酸基である上記（1）記載の化合物TAN-1746、（3）バーティシリウム属に属し、化合物TAN-1746を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に化合物TAN-1746を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする化合物TAN-1746の製造法、（4）上記（1）記載の化合物またはその塩を含有してなる抗腫瘍剤および（5）化合物がTAN-1746である上記（4）記載の抗腫瘍剤を提供するものである。

【0005】上記一般式（I）に関し、Rで表されるアシル化されていてもよい水酸基におけるアシル基としては、例えば有機カルボン酸から誘導されるアシル基等が挙げられる。該アシル基としては、例えばホルミル基、アルカノイル（アルキルカルボニル）基、アリールカルボニル基、アラルキルカルボニル基、アルキルオキシカルボニル基、アリールオキシカルボニル基、アラルキルオキシカルボニル基などが挙げられる。上記アシル基は、好ましくは、アルカノイル基、アリールカルボニル基およびアルキルオキシカルボニル基である。アルカノイル（アルキルカルボニル）基およびアルキルオキシカルボニル基におけるアルキル基としては、例えば炭素数1ないし6の直鎖状もしくは分枝状のアルキル基等が挙げられる。このようなアルキル基としては例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ペンチル、ヘキシル等が挙げられる。アリールカルボニル基およびアリールオキシカルボニル基におけるアリール基としては、例えば炭素数6ないし14のアリール等が挙げられる。このようなアリール基としては、例えばフェニル、トリル、キシリル、ビフェニル、1-または2-ナフチル、1-、2-

または9-アントリル、1-、2-、3-、4-または9-フェナントリル、1-、2-、4-、5-または6-アズレニル等が挙げられる。アラルキルカルボニル基およびアラルキルオキシカルボニル基におけるアラルキル基としては、例えば炭素数7ないし13個のアラルキル基等が挙げられる。このようなアラルキル基としては、例えばベンジル、1-フェニルエチル、2-フェニルエチル、1-フェニルプロピル、2-フェニルプロピル、3-フェニルプロピル、ベンズヒドリル、 $\alpha$ -または $\beta$ -ナフチルメチル等、さらにo-、m-またはp-メチルベンジル、o-、m-またはp-エチルベンジル、o-、m-またはp-tert-ブチルベンジル、2,3-、2,4-、2,5-、2,6-、3,4-または3,5-ジメチルベンジル、2,3,4-、3,4,5-または2,4,6-トリメチルベンジル、5-イソプロピル-2-メチルベンジル、2-イソプロピル-5-メチルベンジル、2-メチル-5-tert-ブチルベンジル、2,4-、2,5-または3,5-ジイソプロピルベンジル、3,5-ジ-tert-ブチルベンジル、1-(2-メチルフェニル)エチル、1-(3-メチルフェニル)エチル、1-(4-メチルフェニル)エチル、1-(2-イソプロピルフェニル)エチル、1-(3-イソプロピルフェニル)エチル、1-(4-イソプロピルフェニル)エチル、1-(2-tert-ブチルフェニル)エチル、1-(4-tert-ブチルフェニル)エチル、1-(2-イソプロピル-4-メチルフェニル)エチル、1-(4-イソプロピル-2-メチルフェニル)エチル、1-(2,4-ジメチルフェニル)エチル、1-(2,5-ジメチルフェニル)エチル、1-(3,5-ジメチルフェニル)エチル、1-(3,5-ジ-tert-ブチルフェニル)エチル等の炭素数1~5のアルキル基を有する置換アラルキル基等が挙げられる。

【0006】複素環カルボニル基における複素環基としては、窒素原子、酸素原子および/または硫黄原子のハテロ原子を1~4個含む5または6員の複素環基があげられる。このような複素環基としては、例えばピロリジニル、ピロリニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、フリル、チエニル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、イソチアゾリル、チアゾリル、ピペリジノ、ピペリジニル、ピリジル、ピリダジニル、ピラジニル、ピペラジニル、ピリミジニル、インドリル、1,2,3-トリアゾリル、1,2,4-トリアゾリル、1,3,4-トリアゾリル、テトラゾリル、1,3-ジオキソラニル、モルホリノ、モルホリニル、2-オキソピロリジニルなどが挙げられる。さらに該複素環基は5又は6員環

(例、ベンゼン、ピリジン、シクロヘキサンなど)と縮合して2環性縮合環基(例、8-キノリル、8-ブリニルなど)を形成していくよい。上記アルキル基、アリール基、アラルキル基、複素環基は、適当な置換基

(例、ヒドロキシ基、カルボキシル基、C<sub>1~6</sub>アルキルで置換されていてもよいアミノ基など)で1または2個置換させていてもよい。前記のアシル基としては、さらに好ましくは炭素数2~7のアシル基(例、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、パレリル、イソバレリル、ピバロイル、ベンゾイル、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニル、イソプロポキシカルボニル、ブトキシカルボニル、tert-ブトキシカルボニル、イソブトキシカルボニルなど)が挙げられる。

【0007】上記一般式(I)中、立体異性体が存在するが、それらの各異性体も本発明に含まれる。また一般式(I)で表される化合物は、塩を形成していくよい。例えば分子中にアミノ基等の塩基性基を有する場合、酸付加塩を形成し、またカルボキシル基等の酸性基を有する場合、塩基塩を形成してもよい。本発明のTAN-1746は、TAN-1746を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に該化合物を生成、蓄積せしめ、これを採取することにより製造される。本発明のTAN-1746の製造に用いることができる微生物としてはバーティシリウム属に属し、TAN-1746を生産する能力を有する微生物であればいずれのものでもよい。例えば、福井県で採取した土壤より分離された糸状菌FL-36581株があげられる。

【0008】FL-36581株の菌学的性状を以下に示す。

#### (a) 各培地における生育状態

##### 1) 麦芽エキス寒天培地

生育は良好で、24℃2週間後のコロニーの直径は、60~70mmであった。表面は盛り上がった羊毛状の菌糸体よりなり、中央部は隆起し、周辺部は薄くなっている。外縁は規則正しく縁取られている。気生菌糸の発達は良好で、厚膜胞子が多数観察された。中央部から周辺部にかけて灰白色から白色を呈する。裏面の中央部から周辺部にかけては暗黄褐色から黄褐色を呈する。可溶性色素の生成は認められない。

##### 2) パレイショ・ブドウ糖寒天培地

生育は中程度で、24℃2週間後のコロニーの直径は、35~45mmであった。表面は盛り上がった羊毛状の菌糸体よりなり、周辺部にかけてやや薄くなっている。外縁は規則正しく縁取られている。気生菌糸の発達、分生子の形成は良好であり、厚膜胞子も多数観察される。中央部から周辺部にかけて灰白色から白色を呈する。裏面の中央部は暗黄褐色を呈し、中間部から周辺部にかけては黄褐色から黄色を呈する。可溶性色素の生成は認められない。pH3~pH12のいずれでも生育は良好、生育温度範囲は10℃~30℃である。23℃~27℃が至適温度である。37℃では生育しない。

##### 3) ツアペック寒天培地

生育は中程度で、24℃2週間後のコロニーの直径は、

55～60mmであった。表面は平坦でピロード状の菌糸体よりなり、放射状に薄くひろがる。外縁は規則正しく縁取られている。気生菌糸の発達は良好である。中央部から周辺部にかけては灰白色から白色を呈する。裏面は象牙色ないし灰白色を呈する。可溶性色素の生成は認められない。

#### 4) オートミール寒天培地

生育は良好で、24℃2週間後のコロニーの直径は、50～60mmであった。表面は盛り上がった羊毛状の菌糸体よりなり、中央部はやや陥没し、周辺部は薄くなっている。外縁は規則正しく縁取られている。気生菌糸の発達、分生子・厚膜胞子の形成は良好である。中央部は白色を呈し中間部から周辺部にかけて灰白色を呈し、水滴が認められる。裏面中央部は黄色を呈し、中間部から周辺部にかけて象牙色を呈する。可溶性色素の生成は認められない。

#### 【0009】(b) 形態的特徴

分生子柄：明瞭でない。

フィアライド：葡ふく菌糸または気中菌糸から直接に、単生あるいは2～4本輪生状に生じる。細長く、先端に向かって徐々に細くなる。長さ10～15μm。幅1.0～1.5μm（基部）0.4～0.6μm（先端部）  
分生子：フィアロ型分生子。フィアライド先端から1個形成される。梢円形～長梢円形。単細胞で無色、表面は滑面。2.5～3.0×1.3～1.5μm  
石垣状厚膜胞子（Dictyochlamydospore）：気中菌糸より分枝した短い柄の上に、多数の厚膜細胞の集合からなる石垣状厚膜胞子を生じ、多数観察される。全長の大きさは17～20×13～17μmであった。

【0010】以上の結果から本菌株の諸性質は、以下のようにまとめられる。すなわち、葡ふく菌糸または気中菌糸から直接単生あるいは輪生状にフィアライドを形成するが、分生子柄は明瞭でない。フィアライドは細長く先端に向かって徐々に細まる。分生子形成細胞はフィアロ型で、フィアライドの先端に個々に形成される。一定の形をした石垣状の厚膜胞子を形成する。以上の諸性質を、Dr. Walter Gams 著「Cephalosporium-artige Schimmelpilze」( Gustav Fischer Verlag·Stuttgart·1971 )

記載の同定検索表で照合すると、パーティシリウム属

(Verticillium) に属する事が明らかであり、更に詳しく種の検索をすると、本菌株はパーティシリウム クラミドスボリウム (Verticillium chlamydosporium) 群に属すると判断された。したがって、本菌株をパーティシリウム クラミドスボリウム (Verticillium chlamydosporium) FL-36581と同定した。FL-36581株は、平成5年12月21日財団法人・発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 32602として寄託され、また、平成5年12月27日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH）に受託番号FERM P-14038として寄託されている。

【0011】パーティシリウム属に属するTAN-1746の生産菌は、他の糸状菌の場合と同様に、たとえば紫外線、エックス線、放射線などの照射、単胞子分離、種々の変異処理、その他の常用手段で変異させることができ、このような変異株あるいは自然に得られる突然変異株であっても、上記した分類学的性状との比較において実質的に別種とするに足らず、しかも当該化合物を生産する性質を有するものは、すべて本発明方法に利用し得る。TAN-1746生産菌の培養に用いられる培地は該菌が利用し得る栄養源を含むものなら、液状でも固状でもよいが、大量に処理するときは液体培地を用いるのが適当である。培地には、当該生産菌が同化し得る炭素源、窒素源、無機物質、微量栄養源等が適宜配合される。炭素源としては、たとえばグルコース、ラクトース、シュークロース、マルトース、デキストリン、スターチ、グリセリン、マンニトール、ソルビトール、油脂類（例、大豆油、ラード油、チキン油など）、n-パラフィン等が用いられる。窒素源としては、たとえば肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、大豆粉、コーン・スティーブ・リカーや、ペプトン、綿実粉、廃糖蜜、尿素、アンモニウム塩類（例、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなど）等が用いられる。さらに、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウムなどを含む塩類、鉄、マンガン、亜鉛、コバルト、ニッケルなどの金属塩類、リン酸、ホウ酸などの塩類や酢酸、プロピオン酸などの有機酸の塩類が適宜用いられる。その他、アミノ酸類（例、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、リジン、メチオニン、プロリンなど）、ペプチド類（例、ジペプチド、トリペプチドなど）、ビタミン類（例、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、ニコチン酸、B<sub>12</sub>、Cなど）、核酸類（例、プリン、ピリミジン、その誘導体など）等を含有させてもよい。無機酸、有機酸、アルカリ類、緩衝剤等を加えて培地のpHを調節する、あるいは消泡の目的で油脂類、界面活性剤等の適量を添加しても差し支えない。例えば液体培養をする場合、培地のpHは中性付近、特にpH約5ないし8が好ましい。培養温度は約20℃ないし30℃が好ましい。培養時間は約48時間ないし168時間が好ましい。

【0012】培養物から目的とする化合物TAN-1746を採取する方法を以下に述べる。該化合物は中性脂溶性物質であるため、この性質を利用する一般的手段を採用すればよい。また、TAN-1746は主として培養濾液中に含まれるため、例えば次のような方法が採用される。まず培養液に濾過補助剤を加えて、濾過あるいは遠心分離によって菌体を除去する。得られた濾液をpH約1.5ないし10、好ましくはpH約3ないし8に調整後、水と混和しない有機溶媒、例えはジクロロメタン、クロロホルム等のハログン化炭化水素類、酢酸エチル等のエステル類、メチルイソブチルケトン等のケトン類あるいはブタノール等のアルコール類などを加え、T

TAN-1746を抽出する。得られた有機溶媒層を希アルカリ（例、水酸化カリウム、水酸化ナトリウム等のアルカリ金属水酸化物、炭酸水素ナトリウム、炭酸ナトリウム等のアルカリ金属炭酸水素塩またはアルカリ金属炭酸塩等）水、希酸（例、塩酸、クエン酸等）水、水等で洗浄後、有機溶媒層を濃縮するとTAN-1746を含有する粗物質が得られる。粗物質をさらに精製し、純粋なTAN-1746を得るには周知の種々のクロマトグラフィー法が有利に用いられる。担体としては例えばシリカゲル、結晶セルロース、吸着性樹脂（例、ダイヤイオンHP-20（三菱化成社製）、セファデックスLH-20（ファルマシア社製、スウェーデン）など）が用いられ、これらは通常カラムクロマトグラフィー法で行なわれる。カラムから活性物質を溶出する方法は担体の種類により適宜選択されるが、適當な有機溶媒、たとえばクロロホルム、ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素類、トルエン等の芳香族炭化水素類、酢酸エチル等のエステル類、アセトン等のケトン類、メタノール等のアルコール類、ヘキサン等の炭化水素類などの単独あるいはこれらの混合溶媒が、または、水と混和し得る有機溶媒と水溶液たとえば水、前述の希アルカリ水、希酸性水、緩衝液などとの混合溶媒が用いられる。さらに、化合物を最終的に精製する場合に、分取用高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法も有利に用いられる。担体としては、例えばオクタデシルシラン（ODS）系およびシリカゲル系のもの等が有利に用いられる。例えばODSを使用する場合、YMCゲル（山村化学研究所製）またはTSKゲル（東洋曹達工業社製）などが用いられ、移動相としては、例えばメタノール等のアルコール類またはアセトニトリル等のニトリル類と水または塩類含有水溶液の混合物が有利に用いられる。

【0013】以下に、後述する実施例1で得られたTAN-1746の物理化学的性状を示す。

(1)外観：白色粉末

(2)比旋光度： $-6.8^{\circ}\text{C}$  (c 0.50、メタノール、22°C)

(3)分子量：528 M<sup>+</sup> (EI-マススペクトル)

(4)元素分析値：(%)

実測値；C, 63.23; H, 7.76; N, 10.61

計算値；C, 63.62; H, 7.63; N, 10.60

(5)分子式：C<sub>28</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>

(6)紫外部吸収(UV)スペクトル：メタノール中、極大値： $235\text{nm}$  ( $\epsilon$  3, 900)

(7)赤外線吸収(IR)スペクトル：KBr錠剤中、主な吸収を示す(波数, cm<sup>-1</sup>)。

【図1】3460, 3310, 2980, 2940, 2860, 1680, 1630, 1530, 1430

(8)<sup>13</sup>C核磁気共鳴(NMR)スペクトル：75MHz, 重クロロホルム中, δ ppm

【図2】212.4 (s), 175.6 (s), 174.3 (s), 172.9

(s), 171.9 (s), 137.0 (s), 129.1 (d) x2, 128.6 (d) x2, 126.7 (d), 72.6 (d), 58.8 (s), 57.8 (d), 54.3 (d), 53.4 (d), 47.0 (t), 37.3 (t), 35.8 (t), 28.8 (t), 28.8 (t), 26.5 (q), 25.2 (t), 25.0 (t), 24.8 (t), 23.6 (q), 23.3 (t), 19.9 (q)

(ただし、sはシングレット、dはダブルット、tはトリプレット、qはカルテットをそれぞれ示す。)

(9)呈色反応：

陽性；リンモリブデン酸、過マンガン酸カリウム反応

陰性；坂口、エールリッヒ反応

(10)高速液体クロマトグラフィー(HPLC)：

担体；YMC-Pack A-312, ODS

移動相；40%アセトニトリル/0.01Mリン酸緩衝液(pH 6.3)

流速；2m1/分

検出法；214 nm

溶出時間；5.7分

(11)薄層クロマトグラフィー(TLC)：

担体；シリカゲル60F254（メルク社製、ドイツ）

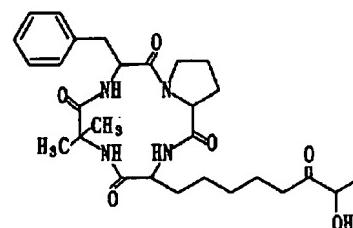
展開溶媒；クロロホルム：メタノール(49:1)

Rf値；0.30

(12)性質：中性脂溶性物質

【0014】以上のデータおよびNMRスペクトルの詳細な検討により、TAN-1746の構造は下式に示すとおりであることが判明した。

【化3】



一般式(I)で表される化合物は、例えば、TAN-1746を、アシル化反応に付すことにより製造することができる。

【0015】本反応に用いられるアシル化剤としては、例えば前記のアシル基を誘導する有機カルボン酸またはその反応性誘導体が用いられる。カルボン酸の反応性誘導体としては、例えば常法に従って製造することができる酸ハライド、酸無水物、活性アミド、活性エステル、活性チオエステル等が用いられる。このような反応性誘導体を具体的に述べると次のとおりである。

1) 酸ハライド：例えば酸クロリド、酸プロミド等が用いられる。

2) 酸無水物：例えば対称型酸無水物、モノC<sub>1-6</sub>アルキル炭酸混合無水物、脂肪族カルボン酸（例、酢酸、ピバル酸、吉草酸、イソ吉草酸、トリクロル酢酸等）からなる混合酸無水物、芳香族カルボン酸（例、安息香酸等）からなる混合酸無水物等が用いられる。対称型酸無

水物としては、例えば無水酢酸、無水プロピオン酸、無水ブタン酸等のC<sub>1-6</sub>アルキルカルボン酸無水物などがあげられる。

3) 活性アミド：例えばピラゾール、イミダゾール、4-置換イミダゾール、ジメチルピラゾール、ベンゾトリアゾール等とのアミドが用いられる。

4) 活性エステル：例えばメトキシメチルエステル、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールエステル、N-ヒドロキシー-5-ノルボルネー-2, 3-ジカルボキシimidエステル、4-ニトロフェニルエステル、2, 4-ジニトロフェニルエステル、トリクロロフェニルエステル、プロパルギルエステル、ペンタクロロフェニルエステル等のエステルのほか、1-ヒドロキシ-1H-2-ピリドン、N-ヒドロキシサクシンimid、N-ヒドロキシタルイミド等とのエステル等が用いられる。

5) 活性チオエ斯特ル：例えば2-ピリジルチオール、2-ベンゾチアソリルチオールなどの複素環チオール等とのチオエ斯特ル等が用いられる。以上のような各種反応性誘導体は、カルボン酸の種類によって適宜選択される。

【0016】前記のアシル化剤は、原料化合物TAN-1746 1モルに対し、例えば約1モル以上使用でき、約1ないし30モル程度が好ましい。本反応は反応を阻害しない溶媒中、あるいは溶媒の非存在下に行われる。反応を阻害しない溶媒としては、例えばアセトン等のケトン類；ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン等のエーテル類；酢酸、プロピオン酸等のカルボン酸類；アセトニトリル等のニトリル類；ベンゼン、トルエン、キシレン等の炭化水素類；ジクロロメタン、クロロホルム、1, 2-ジクロロエタン等のハログン化炭化水素類；酢酸エチル等のエ斯特ル類；ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド等のアミド類；トリエチルアミン、トリブチルアミン、N-メチルモルホリン、N-メチルピペリジン、N, N-ジメチルアニリン等の三級アミン；ピリジン、ピコリン、ルチジン、コリジン等のピリジン類等が用いられる。これらは一種のみで、または二種以上適當な割合で混合して用いてよい。

【0017】本アシル化反応は、原料化合物のアシル化を促進しうる触媒を用いることによりさらに有利に進行する。該触媒としては、例えば塩基触媒、酸触媒が用いられる。塩基触媒としては、例えば三級アミン〔例、トリエチルアミンのような脂肪族三級アミン、ピリジン、α-、β-またはγ-ピコリン、2, 6-ルチジン、4-ジメチルアミノピリジン、4-(1-ピロリジニル)ピリジン、ジメチルアニリン、ジエチルアニリンのような芳香族三級アミン等〕、ハロゲン化アルカリ金属

(例、フッ化カリウム、無水ヨウ化リチウム等)、有機酸塩(例、酢酸ナトリウム)などが用いられる。酸触媒としては、例えばルイス酸(例、無水塩化亜鉛、無水塩

化アルミニウム(AlCl<sub>3</sub>)、四塩化チタン(TiCl<sub>4</sub>)、四塩化錫(SnCl<sub>4</sub>)、五塩化アンチモン、塩化コバルト、塩化第二銅、三フッ化ホウ素エーテラート等)、無機強酸(例、硫酸、過塩素酸、塩化水素、臭化水素等)、有機強酸(例、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、トリフルオロ酢酸、トリクロロ酢酸、カンファースルホン酸等)、酸性イオン交換樹脂(例、ポリスチレンスルホン酸等)などが用いられる。上記の触媒としてはカンファースルホン酸、ピリジン、4-ジメチルアミノピリジンなどが好ましい。触媒の使用量は原料化合物のカルボン酸によるアシル化を促進し得る触媒量程度でよく、通常原料化合物1モルに対して約0. 001ないし10モル、好ましくは約0. 001ないし1モルである。反応温度は特に限定されないが、通常約-30ないし100℃、好ましくは約10ないし50℃である。反応時間は数分ないし数十時間程度(例えば約5分ないし30時間等)である。かくして得られる目的化合物(I)またはその塩は、自体公知の手段、例えば濃縮、転溶、溶媒抽出、凍結乾燥、結晶化、再結晶、分留、クロマトグラフィーなどにより単離精製することができる。

【0018】以下に、実施例1で得られたTAN-1746の生物活性について述べる。

#### 実験例1

TAN-1746のマウスおよびヒト腫瘍細胞に対する増殖阻害作用

腫瘍細胞として、B16メラノーマ(melanoma)(財団法人がん研究振興財団リサーチ・リソースバンクより入手)、P815マストサイトマ(mastocytoma)(アメリカンタイプカルチャーコレクション(American Type Culture Collection(ATCC))より入手)、HeLa-S3エピテロイド・カルシノーマ(epithelial carcinoma)(財団法人発酵研究所(IFO)より入手)、およびG361マリグナント・メラノーマ(malignant melanoma)(財団法人発酵研究所(IFO)より入手)を使用した。5μM 2-メルカプトエタノール、2mM L-グルタミン、20μg/mlゲンタミシン(フロー・ラボラトリーズ社製、スコットランド)、10% (容量/容量)牛胎児血清(ウイックター・エム・エー・バイオプロダクツ社(以下MABと略記)製、米国)および上記の各腫瘍細胞2×10<sup>4</sup>/ml(B16のみ5×10<sup>4</sup>/ml)ずつを含む各イーグルMEM培地(MAB製; P-815とEL-4の場合はRPMI 1640培地(MAB製)]に、TAN-1746を適宜加え、37℃、5% (容量/容量)炭酸ガス下で3日間培養した後、MTT還元法(多田ら、ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソードズ(Journal of Immunological Methods)第93巻、157頁、1986年)に従って各腫瘍細胞の増殖を測定した。各腫瘍細胞に対するTAN-1746の50%阻害濃度(ng/ml)の

測定結果を〔表1〕に示す。

【表1】

【0019】

TAN-1746の腫瘍細胞増殖阻害作用

腫瘍細胞		50%阻害濃度 (ng/ml)
マ	B16メラノーマ (melanoma)	7.5
ウ	P815マストサイトーマ (mastocytoma)	4.7
ヒ	HeLa-S3 エピテロイド・カルシノーマ	8.1
由	G361 マリグナント・メラノーマ	
来	(malignant melanoma)	7.3

〔表1〕に示したように、TAN-1746は、各種の腫瘍細胞に対して増殖抑制作用を示した。

【0020】実験例2

TAN-1746のマウスNIH3T3正常細胞およびガン化NIH3T3細胞に対する増殖阻害作用  
マウスNIH3T3正常細胞 (IFOより入手) および活性型erbB2 [ネイチャー (Nature) 第319巻, 226頁 (1986) およびネイチャー (Nature) 第319巻, 230頁 (1986)]、src [ジャーナル・オブ・バイロロジー (J. Virology) 第36巻, 50頁 (1980)] またはHa-ras [セル (Cell) 第29巻, 161頁 (1982)] の各ガン遺伝子でそれぞれ形質転換したマウスNIH3T3細胞を、2×10

細胞のみ  $5 \times 10^3$  / ウエル (rateで形質転換したマウスNIH3T3細胞のみ  $5 \times 10^3$  / ウエル) となるように96穴プレートに播種した。これらの細胞を  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  カナマイシン (フロー・ラボラトリーズ社製、スコットランド) および10% (容量/容量) 牛胎児血清 (ウイッターカー・エム・エーバイオプロダクト社製、米国) を含むダルベッコMEM培地 (フローラボラトリース社製) で一晩培養した。TAN-1746を該培地に適宜加え、37°C、5% (容量/容量) 炭酸ガス下で3日間培養した後、実験例1と同様にMTT還元法に従って各細胞の増殖を測定した。各細胞に対するTAN-1746の50%阻害濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) の測定結果を〔表2〕に示す。

【表2】

TAN-1746のNIH3T3正常細胞およびガン化細胞に対する増殖阻害作用

細胞	50%阻害濃度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
マウスNIH3T3正常細胞	10
ガン化に活性型erbB2	0.72
用いたsrc	0.22
遺伝子Ha-ras	0.16

〔表2〕に示したように、TAN-1746は、NIH3T3正常細胞に比べ、ガン化細胞に対して強い増殖抑制作用を示した。さらに顕微鏡観察においてTAN-1746はがん化細胞の形態を正常に復帰する活性が認められた。

【0021】実験例3

マウス腫瘍細胞M5076をマウスの静脈内に移植し、これにTAN-1746を腹腔内投与した。TAN-1746 25mg/kgの投与量で腫瘍の増殖は有意に抑制された。

実験例4

TAN-1746をマウスに200mg/kg腹腔内投与したところ、死亡例は認められなかった。

【0022】本発明の化合物は、イン・ビトロ (in vitro) およびイン・ビボ (in vivo) 試験で抗腫瘍作用を

示し、低毒性で、ヒトや哺乳動物 (例、ラット、マウス、サル、イヌ、ウマ、ウシ等) の悪性腫瘍の治療に用いることができる。該悪性腫瘍としては、例えば上皮性悪性腫瘍 (例、大腸がん、肺がん、胃がん、肝がん、偏平上皮がん等)、非上皮性悪性腫瘍 (例、細網肉腫、骨肉腫、リンパ肉腫等)、混合性悪性腫瘍 (例、副腎腫瘍等) 等が挙げられる。本発明の化合物またはその塩を有効成分とする抗腫瘍剤は、一般式(I)で表される化合物またはその塩を常法に従い薬理学的に許容される担体と混合することにより得られる。本剤は、非経口剤または経口剤として投与することができる。非経口剤としては、例えば注射剤、点滴剤、外用剤 (例、経鼻投与剤、経皮製剤など)、座剤 (例、直腸座剤、陰茎座剤など) 等が、経口剤として、例えばカプセル剤、錠剤、シロップ剤、散剤および顆粒剤があげられる。これらの製

剤は、製剤工程において通常一般に用いられる自体公知の方法により製造することができる。たとえば、化合物(I)またはその塩を分散剤(例、ツイーン(Tween)80(アトラスパウダー社製、米国)、HCO 60(日光ケミカルズ製)ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウムなど)、保存剤(例、メチルパラベン、プロピルパラベン、ベンジルアルコール、クロロブタノールなど)、等張化剤(例、塩化ナトリウム、グリセリン、ソルビトール、ブドウ糖など)などと共に水性注射剤に、あるいはオリーブ油、ゴマ油、ラッカセイ油、綿実面、コーン油などの植物油、プロピレングリコールなどに溶解、懸濁あるいは乳化して油性注射剤に成形し、注射剤とすることができる。

【0023】たとえば外用剤とするには、自体公知の方法に従い、本発明の化合物(I)またはその塩を固状、半固状または液状の外用投与剤とすることができます。たとえば、上記固状のものとしては、化合物(I)またはその塩をそのまま、あるいは賦形剤(例、グリコール、マンニトール、デンプン、微結晶セルロースなど)、増粘剤(例、天然ガム類、セルロース誘導体、アクリル酸重合体など)などを添加、混合して粉状の組成物とする。上記液状のものとしては、注射剤の場合と同様で、油性あるいは水性懸濁剤とする。半固状の場合は、水性または油性のゲル剤、あるいは軟膏状のものがよい。また、これらはいずれも、pH調節剤(例、炭酸、リン酸、クエン酸、塩酸、水酸化ナトリウムなど)、防腐剤(例、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、塩化ベンザルコニウムなど)などを加えてもよい。たとえば坐剤とするには、自体公知の方法にしたがい、本発明の化合物(I)またはその塩を油性または水性的固状、半固状あるいは液状の坐剤とすることができます。上記坐剤に用いる油性基剤としては、たとえば高級脂肪酸のグリセリド[例、カカオ脂、ウイテブソル類(ダイナマイトイノーベル社製)など]、中級脂肪酸[例、ミグリオール類(ダイナマイトイノーベル社製)など]、あるいは植物油(例、ゴマ油、大豆油、綿実油など)などが挙げられる。また、水性基剤としては、たとえばポリエチレングリコール類、プロピレングリコール、水性ゲル基剤としては、たとえば天然ガム類、セルロース誘導体、ビニール重合体、アクリル酸重合体などが挙げられる。

【0024】たとえば経口投与剤にするには、自体公知の方法に従い、本発明の化合物(I)またはその塩をたとえば賦形剤(例、乳糖、白糖、デンプンなど)、崩壊剤(例、デンプン、炭酸カルシウムなど)、結合剤(例、デンプン、アラビアゴム、カルボキシメチルセルロース、ポリビニールピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロースなど)または滑沢剤(例、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール6000など)などを添加して圧縮成形し、次いで必要により、味

のマスキング、直溶性あるいは持続性の目的のため自体公知の方法でコーティングすることにより経口投与剤とすることができます。そのコーティング剤としては、例えばヒドロキシプロピルメチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリオキシエチレングリコール、ツイーン80、ブルロニックF68、セルロースアセテートフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、ヒドロキシメチルセルロースアセテートサクシネット、オイドラギット(ローム社製、西ドイツ、メタアクリル酸・アクリル酸共重合)および酸化チタン、ベンガラ等の色素が用いられる。本発明の抗腫瘍剤をヒトに用いる場合の投与量は対象の疾患、投与経路、治療する患者個々の年齢及び疾病の程度によって変動し得るが、通常、有効成分(化合物(I)の含量)として、1日成人(体重50kg)1人当たり約10mgないし2g、とりわけ約20mgないし1gを疾患の治療に用いるのが好ましい。本発明の製剤は、1日1ないし3回に分けて投与することができる。

【0025】以下実施例によって本発明の内容をさらに具体的に説明するが、これによって本発明が限定されるものではない。なお、培地におけるパーセントは、とくに断りのない限り重量/容量パーセント(%)を表す。

#### 実施例1

ポテトデキストロースアガー斜面寒天培地に培養したバーティシリウム・クラミドスボリウム FL-3658 1株を2L容坂口フラスコ内のグルコース2%、マルトース3%、生大豆粉1.5%、コーンスティープ・リカー1%、ポリペプトン0.5%、酵母エキス0.3%および塩化ナトリウム0.3%を含む500mlの種培地(pH 6.0)に接種し、28℃、48時間往復振盪機上で培養し、種培養液を得た。この種培養液1リットルを200リットル容ステンレス・スチール・タンク内の、グリセリン1%、マルトース3%、綿実粉2%、コーン・スティープ・リカー1%、ビール酵母0.5%、沈降性炭酸カルシウム0.5%を含む120リットルの主培地(pH 6.5)に移植し、28℃、通気120リットル/分、攪拌160回転/分、内圧1kg/cm<sup>2</sup>の条件で6日間培養し、主培養液を得た。得られた主培養液

108リットルを、濾過補助剤(ラジオライト600、昭和化学工業社製)を用いて濾過した。濾液90リットルのpHを7.0に調整後、酢酸エチル90リットルで抽出した。有機層を0.01N塩酸28リットル、2%炭酸水素ナトリウム水溶液27リットルおよび水26リットルで順次洗浄後、濃縮乾固した。得られた油状物にヘキサン500mlを加え、生じた析出物を濾取してTAN-1746の粗粉末(889mg)を得た。得られた粗粉末をシリカゲルカラムクロマトグラフィー50ml(キーゼルゲル60, 70~230メッシュ、メルク社製、ドイツ)に付し、酢酸エチル:ヘ

キサン [5 : 5 (200ml)、7 : 3 (150ml)] で洗浄後、酢酸エチル : ヘキサン [9 : 1 (250ml)]、酢酸エチル (50ml) で順次溶出した。溶出液を濃縮乾固して得られた粉末 (315mg) を、分取HPLC [カラム ; YMC-Pack, D-ODS-5(S-5 120A), 移動相 ; 3.3%アセトニトリル / 0.02Mリン酸緩衝液 (pH 6.3), 流速 ; 1.0ml/分] に付した。分析用HPLCで単一ピークを与える画分を集めて濃縮し、pHを6.3に調整後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水洗して硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮乾固したところ、TAN-1746の白色粉末 (199mg) が得られた。

#### 【0026】製剤例1

実施例1で得られたTAN-1746を用いて、下記に示す处方の全成分を常法にしたがって混和し、ゼラチンカプセルに充填し、カプセル1個当たり、30mgのTAN-1746を含有するカプセル剤を製造した。

TAN-1746	30 mg
乳糖	100 mg
コーンスターチ	40 mg
ステアリン酸マグネシウム	10 mg

合計 180 mg

#### 製剤例2

実施例1で得られたTAN-1746およびステアリン酸マグネシウムを常法にしたがって可溶性デンプンの水

溶液で顆粒化し、乾燥後、乳糖およびコーンスターチと混合した。混合物を圧縮成型し、下記に示す处方の錠剤を製造した。

TAN-1746	30 mg
乳糖	65 mg
コーンスターチ	30 mg
可溶性デンプン	35 mg
ステアリン酸マグネシウム	20 mg

合計 180 mg

#### 製剤例3

実施例1で得られたTAN-1746を30% (w/v) ポリエチレングリコール400を含む生理食塩水に溶解してTAN-1746の0.05%溶液を調製し、滅菌濾過して、バイアルに30mlずつ分注した。バイアル1個当たり、15mgのTAN-1746を含有する静注剤を製造した。

#### 【0027】

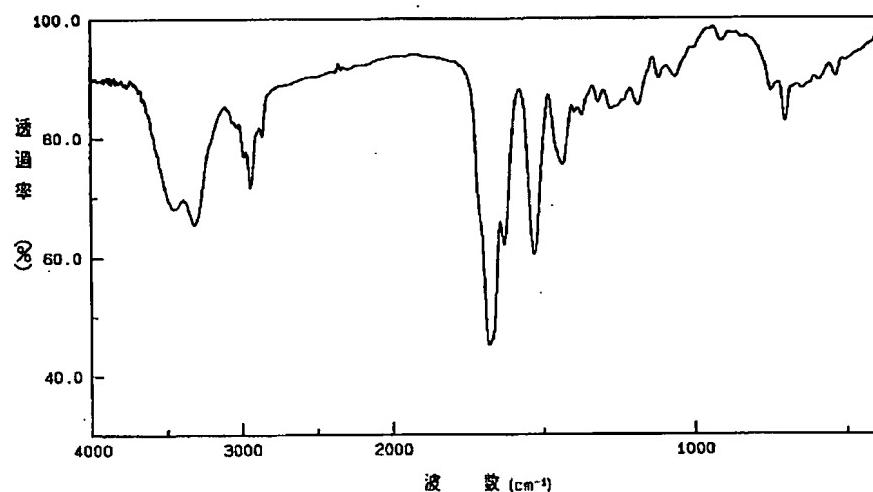
【発明の効果】本発明の化合物は優れた抗腫瘍作用を示し、ヒトや哺乳動物の悪性腫瘍の治療に用いることができる。

#### 【図面の簡単な説明】

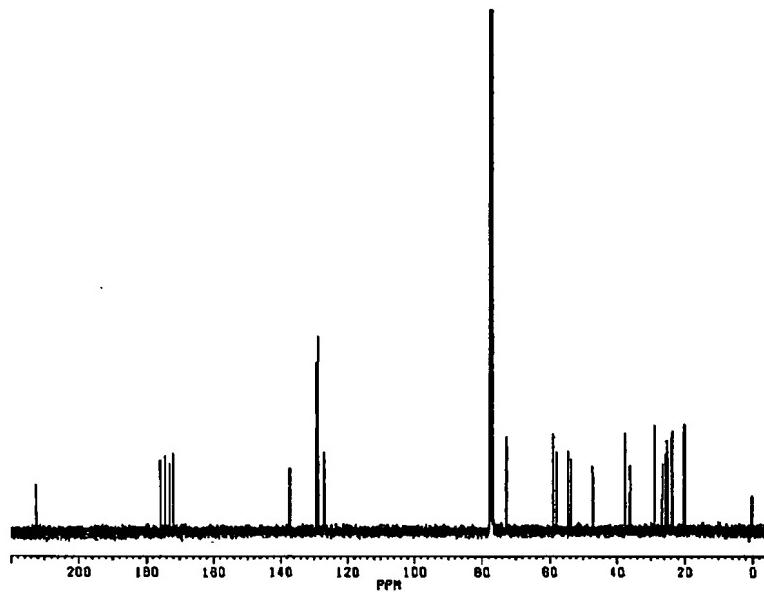
【図1】TAN-1746の赤外線吸収 (IR) スペクトル

【図2】TAN-1746の<sup>13</sup>C核磁気共鳴 (NMR) スペクトル

【図1】



【図2】



---

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

C 1 2 R 1:01)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所